血友病 A, B 患者血漿中の HIV-2抗体： 合成ペプチドイムノアッセイ及び PCR 法を用いての検索

福井 弘 西田 幸世 藤村 吉博

奈良県立医科大学付属病院輸血部

金田美喜夫 嶋 裕子 吉岡 章

奈良県立医科大学小児科学教室

吉 原 なみ子 中 永 和 枝

国立予防衛生研究所

(平成 2 年 6 月 6 日受付)

EVALUATION OF HIV-2 ANTIBODY INFECTION IN JAPANESE HEMOPHILIACS USING A SYNTHETIC PEPTIDE IMMUNOASSAY AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Hiromu Fukui, Sachiyo Nishida and Yoshihiro Fujimura

Department of Blood Transfusion, Nara Medical College

Mikio Kaneda, Hiroko Shima and Akira Yoshioka

Department of Pediatrics, Nara Medical College

Namiko Yoshihara and Kazue Nakanaga

National Institute of Health

The antibodies against HIV-2, the alternative etiologic agent for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), were evaluated on a total of 121 Japanese hemophiliacs (106 hemophilia A, and 15 hemophilia B), using a combination of enzyme-immunoassay (ELAVIA-2), western blotting (LABBLOT 2), and peptide immunoassay (PEPTILAB1-2) provided from Pasteur-Sanofi, France. The twenty eight patients of hemophilia A (26%) and the three of hemophilia B (20%) showed positive results by ELAVIA-2. PEPTILAB 1-2 test specified that only one patient (case X) with hemophilia A has a double reaction to HIV-1 and HIV-2 specific peptides. LABBLOT 2 also demonstrated the immunoreactivity of case X to HIV-2 proteins; p26, gp36, gp105, and gp140. Case X was further examined using polymerase chain reaction (PCR) method to detect proviral DNA sequences of HIV-1 and HIV-2, and finally the possibility of HIV-2 infection was ruled out confirming true HIV-1 infection.

緒 言

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency syndrome, AIDS) は Montagnier¹⁾ら(1983), Gallo²⁾ら(1984), Levy³⁾ら(1984)によりレトロウイルスの一種によって引き起こされることが明らかにされ、1986年ウイルス分類国際委員会で immunodeficiency virus (HIV)と統一して命名された。一方、1986年、同じく Montagnier らは西アフリカの AIDS 患者よ

り新しいタイプのウイルスを分離⁴⁾し、これより従来のものは HIV-1、新しいタイプは HIV-2と区別して呼ばれるようになった。

HIV-1感染による AIDS 発症例は1981年3名の同性愛者中⁵⁾に、また1981年には血友病患者⁶⁾⁷⁾にも見いだされたが、以来、患者数は世界各地で指数関数的に増加し、WHOの1989年11月末での統計⁸⁾では患者発生国は152カ国、患者数はほぼ20万人と報告され、感染者はその10倍にも達すると予

想されている。これに対し、HIV-2感染は西アフリカで風土病的に流行発生しているが、ヨーロッパ、アメリカでは少数例が報告されているにすぎない。

血友病患者の出血治療に使用する第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子濃縮製剤の大半を欧米より輸入していた我が国では血友病患者の HIV-1感染者が1979年より1985年の間に1,000人を超え、AIDS 発症例も100人に達することになった。

著者らは既に教室で観察中の血友病 A、B 及び von Willebrand 病患者について抗 HIV 抗体の年次推移と Western blot 法によるエピトープ解析の成績を報告した⁹⁾。今回、フランス・パスツール社で開発された HIV-2抗体スクリーニング検査及び確認検査試薬キット更に PCR を用い、教室で観察中の血友病 A 及び B 症例について HIV-2 抗体保有状況について検討した。

対象及び方法

1. 対象：奈良県立医科大学小児科及びその関連病院にて止血管理を行なっている血友病 A 106 例及び血友病 B 15 例の計121例より得られた新鮮並びに-70℃凍結保存血漿（一部血清を使用）サンプル。

2. HIV-1抗体測定：スクリーニング試験法として、富士レビオ社のゼラチン粒子凝集法(Particle Agglutination method: PA 法)を行い、陽性検体については既報の如く Western blot 法で確認した。

3. HIV-2抗体測定法：スクリーニングとして“エラビア EIA2”キット（パスツール社）を、確認試験としては共にパスツール社の“ペプチ・ラブ 1、2”キット及び“ラブ・プロット 2”キットを用いた。

a) エラビア EIA2：マイクロタイタープレートの奇数列に HIV-2抗原を、偶数列に対照となるコントロール抗原をコーティングしてある。HIV-2抗原は CEM 細胞で培養したものを不活化して用い、コントロール抗原は HIV-2未感染 CEM 細胞を HIV-2抗原と同一処理して用いており、false positive を除く工夫がされている。

このマイクロタイタープレートに被検血漿（又

は血清）を加えて反応させ、更にペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG を加えて比色測定し、コントロールの値との差をもって判定した。

b) ラブ・プロット 2：Western blot 法による HIV-2抗体確認用試験である。測定原理は HIV-2 ウイルス蛋白を Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) で可溶化後、還元条件下で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動分離を行い、ニトロセルロース膜に転写後被検血漿（又は血清）と反応させ、その後間接酵素抗体法で結合した IgG 抗体を発色検出するものである。

HIV-2の構成蛋白としては、gag 由来の p26, p16, env 由来の gp140, gp105, gp36, pol 由来の p68, p56, がある。gag, pol, env の 3 種類の蛋白が出現した場合を陽性と判定した。

c) ペプチ・ラブ 1、2：2 種類の合成ペプチドを用いた peptide assay (mono epitope) である。

ペプチド 1 は、HIV-1の膜貫通蛋白を構成する gp41の一部アミノ酸配列 (583~609) に、またペプチド 2 は、HIV-2の相同部位蛋白である gp36の一部アミノ酸配列 (578~603) に相当する合成ペプチドを作成し、これをストリップに固相化したものである。コントロールとして抗ヒト IgG も同時に固相化している(図 1 参照)。測定は酵素免疫法で、被検血漿（又は血清）を膜上で反応させ、次にペルオキシダーゼ標識 IgG 抗体を加え発色させ、コントロールバンドの発色と比較して判定した。

4. PCR¹⁰⁾¹¹⁾：ヘパリン採取末梢血からフィコール密度遠心法によりリンパ球を得、DNA を抽出後 PCR 法にて増幅した。プライマー及びプローブは HIV-1の gag, pol, env 領域より選んだ 3 組 {gag プライマー 1 (1097~1124) プラス鎖、

図1 ペプチ・ラブ 1、2の合成ペプチド・アミノ酸配列

gag プライマー 2 (1184~1211) マイナス鎖, gag プローブ (1141~1181) プラス鎖, env プライマー 1 (7347~7366) プラス鎖, env プライマー 2 (7468~7488) マイナス鎖, env プローブ (7387~7421) プラス鎖, pol プライマー 1 (4084~4101) プラス鎖, pol プライマー 2 (4208~4225) マイナス鎖, pol プローブ (4133~4171) マイナス鎖} を用いた. HIV-2 については gag プライマー 1132~1150 と 1401~1422 と プローブ 1351~1391 また LTR 領域の 9432~9449 と 9577~9596, プローブは 9524~9561 を用いた¹²⁾. 増幅後³²p 標識 プローブ を用い Liquid Hybridization (LH) 法¹³⁾ で検出した. Liquid Hybridization (LH) は, PCR 後のサンプル 15 μ l に³²p 末端標識 プローブ 5 μ l {buffer (66mM NaCl, 22mM EDTA) 10 容に 1M NaCl 中の プローブ 1 容を加えたもの} を加え 95 $^{\circ}$ C 5 分, 56 $^{\circ}$ C 10 分を反応させた後 PAGE を行いオートラジオグラフした.

成 績

1. 血友病 A 及び B 患者血漿中の HIV-1 抗体及び抗 HIV-2 抗体

まず血友病 A 106 例及び血友病 B 15 症例の PA 法による HIV-1 抗体スクリーニング試験並びに WB 法確認試験では血友病 A 42 例 (40%), また B 7 例 (47%) が HIV-1 抗体陽性の結果を得た.

“エラビア EIA2” を用いた HIV-2 抗体のスクリーニング試験では血友病 A 106 例中 28 例 (26%), 血友病 B 15 例中 3 例 (20%) が陽性であった. これら HIV-2 抗体陽性例はすべて HIV-1 抗体も陽性であった.

スクリーニング試験で HIV-2 抗体陽性であった血漿サンプルについて, “ペプチ・ラブ 1, 2” キットを用いて HIV-2 抗体確認試験を行なったところ, 血友病 A 28 例中 1 例 (症例 X) の血漿が陽性所見を呈したが血友病 B 3 例はいずれも陰性であった (表 1). この 1 例の陽性患者血漿は “ラブ・プロット 2” キットで, HIV-2 ウイルスの env 由来蛋白 gp36, gp105, gp140, gag 由来の p26, pol 由来の p68 の蛋白と反応するバンドが検出された (図 2).

表 1 HIV-1 及び HIV-2 (3 キット) の陽性検査結果

	血友病 A	血友病 B
HIV-1	42 (106)	7 (15)
エラビア EIA2	28 (106)	3 (15)
ペプチ・ラブ 1, 2	1 (28)	0 (3)
ラブ・プロット 2	1 (24)	0 (1)

() 内は検査数

図 2 ラブ・プロット 2

因に “ラブ・プロット 2” キットで陽性所見を呈した血友病 A の 1 例 (症例 X) では “ペプチ・ラブ 1, 2” キットで, ペプチド 1 と ペプチド 2 のいずれに対しても発色バンドが観察された (図 3). 症例 X の血漿は 1986 年より凍結されていたが, 図 2 の如く “ラブ・プロット 2” キットによる検索では HIV-2 ウイルスの env 由来蛋白の gp36 の発色バンドは経時的により明瞭になって

図3 ペプチ・ラブ1, 2

表2 PCRの結果

	HIV-1			HIV-2	
	gag	pol	env	gag	LTR
症例X	+	±	-	-	-

いることが観察された。又“ペプチ・ラブ1, 2”キットによる検索では図3の如く1986～1989年のいずれの検体においてもペプチド1に対する発色バンドがペプチド2に対するものよりも強いことが観察された。

2. HIV-1抗体と HIV-2抗体の二重陽性検体のPCR法による検討

症例Xが HIV-1と HIV-2ウイルスの二重感染例か、交叉反応によるものかを識別するためPCR法を施行した。

症例Xの末梢血リンパ球より分離したDNAを前述の如くPCR法を用い検索したところ、表2の如く HIV-1の gag primer pair probeを用いた系で明らかに proviral DNAが検出され(図4), polの系でもコピー数は少ないと思われるが陽性の結果であった。それに対し HIV-2特異 primer 2種(gag, LTR領域)の系ではいずれも陰性で、HIV-2感染の可能性は否定された。

図4 HIV-1 gag primer (DNA PCR)の結果

1:陽性感度コントロール, 2:健康人リンパ球DNA・B, 3:健康人リンパ球DNA・A, 4:症例Xの妻・リンパ球DNA, 5:症例X・リンパ球DNA

考 察

パスツール社で開発されている“エラビア EIA2”は HIV-2感染 CEM細胞から得られた HIV-2ウイルスをアルコールで不活化して抗原として用いた ELISA 法によるスクリーニング試験である。

今回, “エラビア EIA2”キットによるスクリーニング試験を行なったところ血友病 A 106例中28例, 血友病 B 15例中3例が陽性であった。これらの症例は全て Western blot 法で HIV-1抗体の陽性が確かめられた症例である。確認試験としては数種類開発されているが、我々はパスツール社の“ラブ・プロット2”キット及び“ペプチ・ラブ1, 2”キットを用いた。

“エラビア EIA2”キットで陽性であった血友病 A 28例及び血友病 B 3例について“ラブ・プロット2”キットで確認試験を行なったところ、血友病 A の1例(症例X)では HIV-2の env 由来蛋白である gp36のバンドが観察された。本例では1986年以後、HIV-1の検索時に採取保存していたサンプル(HIV-1陽性)で検討すると、経時的に gp36のバンドは増強していた。

HIV-1と HIV-2の二重感染症例は、1987年西アフリカの非血友病の AIDS 症例より初めて見いだされ PCR 法にて、二重感染が確実であることが証明された¹²⁾。

PCR 法は、DNA ポリメラーゼの反応特性を利用して、目的とする DNA の一部分を試験管内で増幅し極微量のサンプルからプロウイルス DNA を高感度に検出する技術である。今後、AIDS 発症にいたる前駆期における HIV 感染の有無や、HIV 抗体陽性の母親から出生した児の HIV 感染の有無を早期に診断する上において非常に有用であると期待されている。

本邦の血友病における HIV-2抗体の検索は豊田¹⁴⁾等が“エラビア EIA2”と“ラブ・プロット 2”を用いて検討し、1 例疑わしい症例を報告しているが PCR 法による最終的な確定診断は行なわれていない。

我々が今回示した HIV-1と HIV-2の抗体スクリーニングで double reaction を呈する血友病例は最終的に PCR 法にて陰性結果を得た。

結 語

血友病患者の HIV-2抗体の検討を行い以下の結果を得た。

1. “エラビア EIA2”を用いたスクリーニング検査では、血友病 A 106例中28例(26%)、血友病 B 15例中 3 例(20%)が陽性であった。

2. スクリーニング検査陽性例を“ベプチ・ラブ 1, 2”を用いて検討したところ、血友病 A 1 例のみが陽性であった。

3. この陽性例を“ラブ・プロット 2”で検討したところ、p26, gp36, p68, gp105, gp140のバンドと反応し陽性と考えられた。

4. 本症例は、HIV-1も陽性であり、HIV-1と HIV-2の二重感染が疑われたが、PCR 法で HIV-1 陽性、HIV-2は陰性であった。

本研究の一部は厚生省、HIV 発症予防研究会(班長：聖マリアンナ大学小児科 山田兼雄教授)よりの研究費助成のもとで行なわれた。

文 献

- 1) Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F.,

- Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L.: Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 120: 868—871, 1983.
- 2) Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Pal-ker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224: 500—503, 1984.
- 3) Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. and Oshiro, L.S.: Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, 225: 840—842, 1984.
- 4) Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champsalmaud, J.L. and Montagnier, L.: Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. *Science*, 233: 343—346, 1986.
- 5) Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. and Saxon, A.: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 305: 1425—1431, 1981.
- 6) Gallo, R.C.: The AIDS virus. *Scientific American*, 256: 39—48, 1987.
- 7) Curran, J.W.: AIDS-two years later. *N.Engl. J. Med.*, 309: 609—611, 1983.
- 8) 山崎修道: HIV 感染者発症予防治療に関する研究. 研究報告書, 1989.
- 9) Fujimira, Y., Hidenoi, M., Nishida, S., Uchida, M., Yoshioka, A., Shima, H. and Fukui, H.: Annual transition and western blot analysis of anti HIV antibodies tested in a total of 189 patients with hemophilia A, B and von Willebrand disease. *J. Nara Med. Ass.*, 39: 542—550, 1988.
- 10) 中 永 和 枝, 吉 原 み な 子: PCR. *Immunohaematology*, 11(2): 113—119, 1989.
- 11) Ou, C.-Y., Kwok, S., Mitchell, S.W., Mack, D. H., Sninsky, J.J., Krebs, J.W., Feorino, K.P., Warfield, D. and Schochetman, G.: DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells.

- Science, 239: 295—297, 1988.
- 12) Rayfield, M., De Cock, K., Heyward, W., Doldstein, L., Krebs, J., Kwok, S., Lee, S., McCormick, J., Moreau, J.M., Odehouri, K., Schochetman, G., Sninsky, J. and Ou, C.-Y.: Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 158: 1170—1176, 1988.
- 13) Abbott, M.A., Poiesz, B.J., Byrne, B.C., Kwok, S., Sninsky, J.J. and Ehrlich, G.D.: Enzymatic gene amplification: Qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. *J. Infect. Dis.*, 158: 1158—1169, 1988.
- 14) 豊田恭徳, 殿内 力, 三間屋純一, 杉山武喜子: 静岡県下血友病患者における Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2)抗体の検討. *エイズジャーナル*, 2(1): 84—88, 1989.
-